

M2170-1  
K. Nakamura, Jol

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2001年 3月 9日

出 願 番 号

Application Number:

特願2001-066001

出 願 人

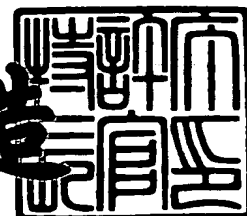
Applicant(s):

栗田工業株式会社

2001年 6月15日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3056610

【書類名】 特許願

【整理番号】 KWI00340

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/11

【発明の名称】 核酸、塩素化エチレン分解細菌検出用核酸、プローブ、  
塩素化エチレン分解細菌の検出方法および塩素化エチレン  
またはエタンの分解方法

【請求項の数】 7

【発明者】

【住所又は居所】 東京都新宿区西新宿三丁目4番7号 栗田工業株式会社  
内

【氏名】 中村 寛治

【発明者】

【住所又は居所】 東京都新宿区西新宿三丁目4番7号 栗田工業株式会社  
内

【氏名】 上野 俊洋

【特許出願人】

【識別番号】 000001063

【氏名又は名称】 栗田工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100067839

【弁理士】

【氏名又は名称】 柳原 成

【電話番号】 03-3436-4700

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2000-227580

【出願日】 平成12年 7月24日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 004477

特 2 0 0 1 - 0 6 6 0 0 1

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0011969

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 核酸、塩素化エチレン分解細菌検出用核酸、プローブ、塩素化エチレン分解細菌の検出方法および塩素化エチレンまたはエタンの分解方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 塩素化エチレン分解細菌の 16S rRNA または rDNA に優先的にハイブリダイズする 18～25 ヌクレオチドからなる核酸であって、配列番号 1～15 のいずれかの塩基配列、これらの塩基配列と 90% 以上のホモロジーを有する塩基配列またはこれらの塩基配列と相補的な塩基配列を有する核酸。

【請求項 2】 塩素化エチレン分解細菌の 16S rRNA または rDNA に優先的にハイブリダイズする 10～50 ヌクレオチドからなる核酸であって、少なくとも 10 個の連続する塩基配列が、配列番号 1～15 のいずれかの塩基配列と同じ塩基配列である核酸。

【請求項 3】 塩素化エチレン分解細菌検出用である請求項 1 または 2 記載の核酸。

【請求項 4】 請求項 1 ないし 3 のいずれかに記載の核酸を放射性元素、酵素、蛍光物質または化学物質で標識した塩素化エチレン分解細菌検出用標識プローブ。

【請求項 5】 請求項 1 ないし 3 のいずれかに記載の核酸をプライマー、試料中の核酸を鋳型として PCR (polymerase chain reaction) を行い、合成された DNA 断片を検出する塩素化エチレン分解細菌の検出方法。

【請求項 6】 請求項 4 記載の塩素化エチレン分解細菌検出用標識プローブと、試料とを接触させて RNA または DNA ハイブリダイゼーションを行った後、標識を指標にして検出する塩素化エチレン分解細菌の検出方法。

【請求項 7】 地下水または土壌を試料として請求項 5 または 6 記載のエチレン分解細菌の検出方法を実施し、

塩素化エチレン分解細菌が検出された地下水、土壌またはそれらを接種した培養液を、塩素化エチレンまたはエタンで汚染された土壌または地下水に導入する

塩素化エチレンまたはエタンの分解方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、塩素化エチレン分解細菌の 16S rRNA または rDNA に優先的にハイブリダイズする核酸、この核酸からなる塩素化エチレン分解細菌検出用標識プローブ、これらの核酸または標識プローブを用いた塩素化エチレン分解細菌の検出方法、および塩素化エチレンまたはエタンの分解方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

塩素化エチレンまたはエタンで汚染された土壌または地下水などを浄化する方法として、汚染土壌中に元来存在する塩素化エチレン分解細菌を利用して、塩素化エチレンを嫌氣的に脱塩素化する方法がある。またこれらの細菌を汚染土壌または地下水に添加する方法も知られている。塩素化エチレン分解細菌は、この細菌が保有する塩素化エチレン分解酵素により、塩素化エチレンだけでなく塩素化エタンも分解することができることも知られている。しかし、このような方法では、処理効果は常に良好、つまり完全に脱塩素化が行われる保証はないという問題点がある。

このため、塩素化エチレン分解細菌を利用して塩素化エチレンまたはエタンで汚染された土壌または地下水などを浄化する場合、脱塩素化が行われるかどうかを予め判定する方法が要望されている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、塩素化エチレン分解細菌の検出に利用することができる核酸であって、塩素化エチレン分解細菌の 16S rRNA または rDNA に優先的にハイブリダイズする新規かつ有用な核酸、この核酸からなる塩素化エチレン分解細菌検出用標識プローブ、これらの核酸または標識プローブを用いた塩素化エチレン分解細菌の検出方法、および塩素化エチレンまたはエタンの分解方法を提案することである。

【 0 0 0 4 】

【課題を解決するための手段】

本発明は次の塩素化エチレン分解細菌の 1 6 S r R N A または r D N A に優先的にハイブリダイズする核酸、この核酸からなる塩素化エチレン分解細菌検出用標識プローブ、これらの核酸または標識プローブを用いた塩素化エチレン分解細菌の検出方法、および塩素化エチレンまたはエタンの分解方法である。

(1) 塩素化エチレン分解細菌の 1 6 S r R N A または r D N A に優先的にハイブリダイズする 1 8 ～ 2 5 ヌクレオチドからなる核酸であって、配列番号 1 ～ 1 5 のいずれかの塩基配列、これらの塩基配列と 9 0 % 以上のホモロジーを有する塩基配列またはこれらの塩基配列と相補的な塩基配列を有する核酸。

(2) 塩素化エチレン分解細菌の 1 6 S r R N A または r D N A に優先的にハイブリダイズする 1 0 ～ 5 0 ヌクレオチドからなる核酸であって、少なくとも 1 0 個の連続する塩基配列が、配列番号 1 ～ 1 5 のいずれかの塩基配列と同じ塩基配列である核酸。

(3) 塩素化エチレン分解細菌検出用である上記 (1) または (2) 記載の核酸。

(4) 上記 (1) ないし (3) のいずれかに記載の核酸を放射性元素、酵素、蛍光物質または化学物質で標識した塩素化エチレン分解細菌検出用標識プローブ。

(5) 上記 (1) ないし (3) のいずれかに記載の核酸をプライマー、試料中の核酸を鋳型として P C R ( p o l y m e r a s e c h a i n r e a c t i o n ) を行い、合成された D N A 断片を検出する塩素化エチレン分解細菌の検出方法。

(6) 上記 (4) 記載の塩素化エチレン分解細菌検出用標識プローブと、試料とを接触させて R N A または D N A ハイブリダイゼーションを行った後、標識を指標にして検出する塩素化エチレン分解細菌の検出方法。

(7) 地下水または土壌を試料として上記 (5) または (6) 記載のエチレン分解細菌の検出方法を実施し、

塩素化エチレン分解細菌が検出された地下水、土壌またはそれらを接種した培

養液を、塩素化エチレンまたはエタンで汚染された土壌または地下水に導入する塩素化エチレンまたはエタンの分解方法。

【 0 0 0 5 】

塩素化エチレン分解細菌を用いて塩素化エチレンまたはエタンで汚染された土壌または地下水などを浄化する方法において処理効果が常に良好でない理由を検討した結果、脱塩素化を行う塩素化エチレン分解細菌が処理現場に生息している場合には処理効果が良好であり、生息していない場合には処理効果が期待できないことが我々の研究で明らかとなった。したがって、対象現場の土壌や地下水を調査し、塩素化エチレン分解細菌が生息しているかどうかを確認すれば、処理が良好に行えるか否かを判断できる。

本発明の核酸を利用することにより塩素化エチレン分解細菌の検出が可能であり、上記のような判定が可能になる。

【 0 0 0 6 】

本発明の核酸は、塩素化エチレン分解細菌の 1 6 S r R N A または r D N A に優先的にハイブリダイズする 1 8 ～ 2 5 ヌクレオチドからなる核酸であって、配列表の配列番号 1 ～ 1 5 のいずれかの塩基配列、これらの塩基配列と 9 0 % 以上のホモロジーを有する塩基配列またはこれらの塩基配列と相補的な塩基配列を有する核酸である。

また本発明の核酸は、塩素化エチレン分解細菌の 1 6 S r R N A または r D N A に優先的にハイブリダイズする 1 0 ～ 5 0 、好ましくは 1 5 ～ 3 5 ヌクレオチドからなる核酸であって、少なくとも 1 0 個の連続する塩基配列が、配列番号 1 ～ 1 5 のいずれかの塩基配列と同じ塩基配列である核酸である。例えば、配列番号 1 の塩基配列の任意の位置から始まる連続した 1 0 個以上の塩基配列と同じ塩基配列を有する核酸であり、この配列番号 1 の塩基配列と同じ塩基配列の上流および／または下流には塩基が結合していてもよい。

【 0 0 0 7 】

本発明の核酸、すなわち配列番号 1 ～ 1 5 の塩基配列、これらの塩基配列と 9 0 % 以上のホモロジーを有する塩基配列、これらの塩基配列と相補的な塩基配列、および少なくとも 1 0 個の連続する塩基配列が配列番号 1 ～ 1 5 のいずれかの

塩基配列と同じである塩基配列は、公知の方法により化学的に容易に合成することができる。

#### 【 0 0 0 8 】

本発明の核酸は塩素化エチレン分解細菌の 1 6 S r D N A の塩基配列を決定後、それらに特異的な部分を利用してデザインしているので、塩素化エチレン分解細菌の 1 6 S r R N A または r D N A に優先的にハイブリダイズする。

#### 【 0 0 0 9 】

上記塩素化エチレン分解細菌の具体的なものとしては、Dehalococcoides 属の細菌などがあげられる。

塩素化エチレン分解細菌により分解（脱塩素化）される塩素化エチレンの具体的なものとしては、テトラクロロエチレン、トリクロロエチレン（TCE）、cis-1, 2-ジクロロエチレン、trans-1, 2-ジクロロエチレン、1, 1-ジクロロエチレン、ビニルクロリドおよびこれらの脱塩素化中間体などがあげられる。また塩素化エチレン分解細菌により分解（脱塩素化）される塩素化エタンの具体的なものとしては、1, 2-ジクロロエタン、モノクロロエタンなどがあげられる。

#### 【 0 0 1 0 】

本発明の核酸は、後述するように、プライマーとして用いてPCRを行うか、またはハイブリダイゼーションを行うことにより塩素化エチレン分解細菌を特異的に高精度で、しかも容易に検出することができる。

#### 【 0 0 1 1 】

本発明の塩素化エチレン分解細菌検出用標識プローブは、前記本発明の核酸を放射性元素、蛍光物質、化学物質または酵素などの標識物質で標識したプローブである。このような標識物質としては従来から使用されている標識物質が使用でき、具体的なものとしては<sup>32</sup>P等の放射性元素；FITC（Fluorescence isothiocyanate）、ローダミン等の蛍光物質；ジコキシゲニン等のハプテン；アルカリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼ等の酵素；ビオチン等の生化学物質などがあげられる。これらの標識物質は、公知の方法で核酸に導入することができる。



## 【0012】

本発明の塩素化エチレン分解細菌検出用標識プローブは、塩素化エチレン分解細菌の有無を検出したい試料とハイブリダイゼーションを実施し、その後標識物質を指標にして検出することにより、標識プローブがハイブリダイゼーションした塩素化エチレン分解細菌を特異的に高精度で、しかも容易に検出することができる。

## 【0013】

本発明の塩素化エチレン分解細菌の検出方法は、前記本発明の核酸を用いて塩素化エチレン分解細菌を検出する方法である。すなわち、前記本発明の核酸をプライマーとし、塩素化エチレン分解細菌の有無を検出したい試料から調製した核酸を鋳型としてPCRを行い、予想される大きさのDNAが合成されれば試料中に塩素化エチレン分解細菌が存在したと判断できる。

## 【0014】

PCRは公知の方法で行うことができ、また市販されているPCR用キットを用いて行うこともできる。PCRは通常Upper PrimerおよびLower Primerの2種類のプライマーを使用するが、いずれか一方または両方のプライマーとして本発明の核酸を用いることができる。プライマーとして種類の異なる複数の核酸を用いて複数回検出を行うことにより、検出精度をより高くすることができる。

## 【0015】

また本発明の塩素化エチレン分解細菌の検出方法は、前記本発明の塩素化エチレン分解細菌検出用標識プローブを用いて塩素化エチレン分解細菌を検出する方法である。すなわち、前記本発明の塩素化エチレン分解細菌検出用標識プローブを、塩素化エチレン分解細菌の有無を検出したい試料またはこの試料から調製した核酸に接触させてRNAまたはDNAハイブリダイゼーションを行った後、標識を指標にして塩素化エチレン分解細菌を検出する方法である。ハイブリダイゼーションは従来と同様の方法により行うことができる。

## 【0016】

ハイブリダイゼーション後の検出は、標識物質の種類に応じて公知の方法によ

り行うことができる。例えば、放射性元素で標識した場合は公知の方法で放射能を測定することにより検出できる。また蛍光物質で標識した場合は公知の方法により光量を測定することにより検出できる。また酵素で標識した場合は公知の方法で酵素活性を測定することにより検出できる。また抗原または抗体で標識した場合は、標識した抗原または抗体と特異的に反応する抗体または抗原を用いて抗原抗体反応させ、反応生成物を公知の方法により測定することにより検出できる。

## 【 0 0 1 7 】

上記のような方法で塩素化エチレン分解細菌を検出することにより、塩素化エチレン分解細菌を利用して塩素化エチレンまたはエタンで汚染された土壌または地下水などを浄化する場合に、脱塩素化が良好に行われるかどうかを予め判定することができる。また塩素化エチレン分解細菌が検出できない場合、塩素化エチレン分解細菌を添加するなどの対策を打つことが可能となる。

## 【 0 0 1 8 】

本発明の塩素化エチレンまたはエタンの分解方法は、地下水または土壌を試料として上記本発明のエチレン分解細菌の検出方法を実施し、塩素化エチレン分解細菌が検出された地下水、土壌またはそれらを接種した培養液（以下、これらをまとめて塩素化エチレン分解細菌検出物等という場合がある）を、塩素化エチレンまたはエタンで汚染された土壌または地下水（以下、これらをまとめて汚染環境という場合がある）に導入して塩素化エチレンまたはエタンを分解する方法である。

## 【 0 0 1 9 】

汚染環境に導入する塩素化エチレン分解細菌検出物等は、どこの場所で検出（採取）されたものでもよい。例えば、塩素化エチレンまたはエタンで汚染されていない場所において塩素化エチレン分解細菌が検出された地下水、土壌またはそれらを接種した培養液を、塩素化エチレンまたはエタンで汚染された土壌または地下水に導入することもできる。また塩素化エチレンまたはエタンで汚染された場所において塩素化エチレン分解細菌が検出された地下水、土壌またはそれらを接種した培養液を、同一区域内の塩素化エチレンまたはエタンで汚染された場所

に導入することもできるし、同一区域でない別の場所に導入することもできる。

【 0 0 2 0 】

塩素化エチレン分解細菌検出物を汚染環境に導入方法としては、塩素化エチレン分解細菌検出物を汚染された土壌表面に散布する方法、注入管（注入井）から土壌中に注入する方法、地下水源に注入する方法などがあげられる。導入地点は汚染された場所はもちろん、汚染環境の上流などに導入することができる。

【 0 0 2 1 】

塩素化エチレンまたはエタンを分解する際、塩素化エチレン分解細菌が検出された地下水、土壌またはそれらを接種した培養液を汚染環境に導入するだけでもよい場合もあるが、場合によっては水、酸素、栄養源等をさらに導入することもできる。また1回の導入により完全に分解できない場合には、導入を繰り返すこともできる。さらに塩素化エチレン分解細菌検出物に凝集剤を添加して凝集させたり、あるいは担体に担持させた後導入することもできる。

このようにして塩素化エチレンまたはエタンを分解することにより、塩素化エチレンまたはエタンで汚染された汚染環境を浄化することができる。

【 0 0 2 2 】

【発明の効果】

本発明の核酸は新規かつ有用である。本発明の核酸は特定の塩基配列を有し、塩素化エチレン分解細菌の16S rRNAまたはrDNAに優先的にハイブリダイズするので、塩素化エチレン分解細菌の検出に利用することができる。

本発明の塩素化エチレン分解細菌検出用核酸は上記核酸からなるので、この核酸を用いることにより、塩素化エチレン分解細菌を特異的に高精度で、しかも容易に検出することができる。

本発明の塩素化エチレン分解細菌検出用標識プローブは上記核酸を標識しているので、この標識を指標にして塩素化エチレン分解細菌を特異的に高精度で、しかも容易に検出することができる。

本発明の塩素化エチレン分解細菌の検出方法は、上記核酸または標識プローブを用いているので、塩素化エチレン分解細菌を特異的に高精度で、しかも容易に検出することができる。

本発明の塩素化エチレンまたはエタンの分解方法は、上記検出方法で塩素化エチレン分解細菌が検出された地下水、土壌またはそれらを接種した培養液を、塩素化エチレンまたはエタンで汚染された土壌または地下水に導入して塩素化エチレンまたはエタンを分解しているので、塩素化エチレンまたはエタンを容易に効率よく分解して環境を浄化することができる。

【 0 0 2 3 】

## 【発明の実施の形態】

次に本発明の実施例について説明する。

【 0 0 2 4 】

## 実施例 1

エチレン化（脱塩素化）が起きている地点 A、B および C、ならびにエチレン化が起きていない地点 D、E および F の合計 6 か所から地下水をサンプリングし、この地下水 1 0 0 m L 中から DNA を下記の通り抽出した。

【 0 0 2 5 】

## (1) DNA の抽出

地下水 1 0 0 m L を孔径 0. 2  $\mu$  m のフィルターで濾過した後、このフィルターを 2 m L 容のチューブに入れた。さらにそのチューブに Z i r c o n i a / S i l i c a B e a d s （直径 0. 1 m m）1 m L および E x t r a c t i o n B u f f e r （1 0 0 m M T r i s - H C l [ p H 8. 0 ] , 1 0 0 m M s o d i u m E D T A [ p H 8. 0 ] , 1 0 0 m M s o d i u m p h o s p h a t e [ p H 8. 0 ] , 1. 5 M N a C l）1 m L を加え、細胞破砕機 B e a d B e a t e r で 2 分間処理した。次に凍結融解を 3 回繰り返した後、1 0  $\mu$  L の P r o t e i n a s e K （1 0 m g / m l）を加え、3 7  $^{\circ}$  C にて 3 0 分間保温した。この液に、2 5 0  $\mu$  L の 1 0 % S D S 溶液を加え、6 5  $^{\circ}$  C で 2 時間保温した後、再び上記の B e a d B e a t e r 処理を行った。その後 8 0 0 0  $\times$  g にて室温で 1 0 分間遠心分離し、上清を採取した。上清はクロロホルム抽出し、等量のイソプロパノールを添加後、室温で 6 0 分間静置、8 0 0 0  $\times$  g にて室温で 2 0 分間遠心分離し、DNA を沈殿させた。沈殿は 7 0 % エタノールで洗浄後、乾燥させた後、5 0  $\mu$  L の滅菌蒸留水に溶解した。

この抽出DNA溶液を利用して下記の通りPCR反応を行い塩素化エチレン分解細菌が存在するか否かを調査した。

【0026】

(2) PCRによる16S rDNAの増幅

前記(1)で得た抽出DNA溶液1 $\mu$ Lをテンプレートにして、16S rDNAをPCRにより増幅した。PCR増幅の反応液の全容量は100 $\mu$ Lとし、2.5UのEx Taq DNA polymerase (宝酒造製)、200 $\mu$ MのdNTPを使用した。プライマーペアとしては、表1に示すように、KWI-De1ないしKWI-De6のいずれかをUpper Primerとし、Bact1492 (5'-ACGG C/T TACCTTGTTAGGACT T-3')をLower Primerとする6組のプライマーペア、およびBact0011 (5'-GTTTGATCCTGGCTCAG-3')をUpper Primerとし、KWI-De7ないしKWI-De15の相補的な塩基配列のいずれかをLower Primerとする9組のプライマーペアをそれぞれ20 pmol使用した。その他の反応液組成はPCRキットに添付のマニュアルに従った。PCR反応は、Pre-heating; 94 $^{\circ}$ C、2分に続き、第1段階; 94 $^{\circ}$ C、20秒、第2段階; 55 $^{\circ}$ C、30秒、第3段階; 72 $^{\circ}$ C、2分を30サイクル繰り返し、Post extension; 72 $^{\circ}$ C、7分を行った。

【0027】

上記PCR反応液2 $\mu$ Lをアガロース電気泳動にかけ、予想される大きさのDNA断片が合成されれば塩素化エチレン分解細菌が存在すると判断した。結果を表1に示す。

【0028】

【表 1】

表 1 地下水からの塩素化エチレン分解細菌の検出結果

No.	Upper Primer	Lower Primer	合成 DNA の長さ (k b)	地点					
				A	B	C	D	E	F
1	KWI-De1	Bact1492	1. 38	○	×	○	×	×	×
2	KWI-De2	Bact1492	1. 34	○	○	○	×	×	×
3	KWI-De3	Bact1492	1. 31	○	○	○	×	×	×
4	KWI-De4	Bact1492	1. 28	○	○	○	×	×	×
5	KWI-De5	Bact1492	1. 26	○	○	○	×	×	×
6	KWI-De6	Bact1492	1. 24	○	○	○	×	×	×
7	Bact0011	KWI-De7と相補的な塩基配列	0. 91	×	○	○	○	○	○
8	Bact0011	KWI-De8と相補的な塩基配列	0. 82	○	○	○	○	○	○
9	Bact0011	KWI-De9と相補的な塩基配列	0. 80	○	○	○	○	○	○
10	Bact0011	KWI-De10と相補的な塩基配列	0. 98	○	○	○	○	○	○
11	Bact0011	KWI-De11と相補的な塩基配列	1. 01	○	○	○	○	○	○
12	Bact0011	KWI-De12と相補的な塩基配列	1. 10	○	○	○	○	○	○
13	Bact0011	KWI-De13と相補的な塩基配列	1. 22	○	○	○	○	○	○
14	Bact0011	KWI-De14と相補的な塩基配列	1. 24	○	○	○	○	○	○
15	Bact0011	KWI-De15と相補的な塩基配列	1. 40	○	○	○	○	○	○

○ : DNAの合成が観察された

× : DNAの合成が観察されない

【0029】

表1のKWI-De1～KWI-De15の塩基配列は表2に示す次の通りである。

【0030】

【表 2】

表 2

	配列番号	塩基配列 (5' から 3' )
KWI-De1	配列番号 1	GTCTTAAGCAATTAAGATAG
KWI-De2	配列番号 2	CGCGTAAGTAACCTACCTCTAAGT
KWI-De3	配列番号 3	GCTTCGGGAAACTGAAGG
KWI-De4 * 1	配列番号 4	TGGRCCGACATATGTTGGTT
KWI-De5	配列番号 5	CACTAAAGCCGTAAGGCGCT
KWI-De6	配列番号 6	TGGTGAGGGGCTTGCCTCCG
KWI-De7	配列番号 7	GTGAGCGTAGGTGGTCTTTC
KWI-De8	配列番号 8	CAGCAGGAGAAAACGGAATT
KWI-De9	配列番号 9	GTATAGGGAGTATCGACCC
KWI-De10	配列番号 1 0	TGTAGTAGTGAAGTAAAGGGGAAC
KWI-De11	配列番号 1 1	GACCTGTTAAGTCAGGAAGTGCAC
KWI-De12	配列番号 1 2	TGTTGCTAGTTAAATTTTC
KWI-De13	配列番号 1 3	GTTGCAACAGTGCGAACTGG
KWI-De14	配列番号 1 4	GCTAATCCCCAAAGCTGTC
KWI-De15	配列番号 1 5	GTCGATGTGCCAACCGCAAGG

\* 1 塩基配列中RはAまたはGである。

【 0 0 3 1 】

表 1 の結果から、エチレン化が観察されている A、B、C 地点では、前記 PCR および電気泳動により DNA 合成が観察されなかった例外は 4 8 回中 5 回観察されたが、ほとんど DNA 合成が観察された。一方、エチレン化が全く観察されない D、E、F 地点では DNA 合成は全く観察されなかった。この結果から、エチレン化反応が起きている地点では、必ず塩素化エチレン分解細菌が存在し、これらのモニタリングが可能であることが示された。

【 0 0 3 2 】

## 実施例 2

## (1) Light Cyclerによる検出

実施例1の抽出DNA溶液について、さらに高精度なPCR検出をロッシュ・ダイアグノスティック株式会社製のLight Cyclerを用いて行った。

その際、Upper PrimerとしてはKWI-De8を、Lower PrimerとしてはKWI-De15に相補的なオリゴヌクレオチドを利用した。また、ハイブリダイゼーションプローブとして、KWI-De10の3'末端をFITC (Fluorescence isothiocyanate) にて標識したもの、およびKWI-De11の3'末端をリン酸化し、5'末端をFITCにて標識したものを使用した。PCR反応にはLight Cycler DNA Master Hybridization Probesキット(商標)を使用した。反応条件は表3～表6に示す通りである。

【0033】

【表3】

表3 変性

サイクル数=1				
セグメント	標的溫度 (°C)	保持時間 (s)	溫度變化速度 (°C/s)	蛍光検出
1	95	120	20	なし

【0034】



【表 4】

表 4 変性

サイクル数=50 (セグメント1→2→3→再び1へ)				
セグメント	標的温度 (°C)	保持時間 (s)	温度変化速度 (°C/s)	蛍光検出
1	95	0	20	なし
2	54	15	20	1回検出
3	72	30	2	なし

【0035】

【表 5】

表 5 変性

サイクル数=1				
セグメント	標的温度 (°C)	保持時間 (s)	温度変化速度 (°C/s)	蛍光検出
1	95	0	20	なし
2	44	10	20	なし
3	85	0	0.2	連続検出

【0036】

【表 6】

表 6 変性

サイクル数 = 1				
セグメント	標的溫度 (°C)	保持時間 (s)	溫度変化速度 (°C/s)	蛍光検出
1	40	30	20	なし

## 【0037】

結果は、地点A、B、Cの地下水では目的のDNAがPCR合成され、塩素化エチレン分解細菌が存在することが分かった。しかしながら、地点D、E、Fでは目的のDNAは合成されず塩素化エチレン分解細菌は存在しないと判断された。このように、表2に示されたプライマーはハイブリダイゼーションプローブとしても利用できることがわかる。

## 【0038】

## 実施例 3

c i s -ジクロロエチレン (c i s -DCE) で汚染されている土壌100gと地下水50mLを150mL容積のバイアルビンに入れ、乳酸を100mg/Lの濃度となるように添加した後ブチルゴム栓をし、アルミキャップでシールした。バイアルビンは同じものを2個用意し、一方のバイアルビンには塩素化エチレン分解細菌遺伝子が検出された菌懸濁液を植菌し、塩素化エチレン分解遺伝子が最終濃度で $10^5$ copies/mLになるようにした。また他方のバイアルビンには何も植菌せず、コントロールとした。これらのバイアルビンを30°Cで静置培養しながら定期的にサンプリングを行い、バイアルビン中のエチレン類の濃度を測定した。結果を図1および図2に示す。

## 【0039】

塩素化エチレン分解遺伝子が検出された菌懸濁液を添加した場合 (図1)、塩

素化エチレン分解は実験開始約 2 0 日で顕著となり、塩化ビニル (V C) が検出され始めた。その後、V C も分解され、約 1 3 5 日で完全にエチレンに転換された。一方コントロールの場合 (図 2)、試験期間中塩化ビニルおよびエチレンは全く検出されなかった。

上記結果から、塩素化エチレン分解細菌が検出された液を添加することは塩素化エチレン分解反応を促進する効果があることがわかる。

#### 【 0 0 4 0 】

##### 実施例 4

塩素化エチレンで汚染されている現場の 1 m 離れた 2 点に井戸 (A および B) を設置し、B 地点から 3 L / m i n で揚水し、その水を A 地点に注入した。A 地点への注入の際には、乳酸を 1 0 0 m g / L の濃度で添加した。汚染帯水層は地面より 3 m 下にあり、帯水層厚は 4 m であった。

B 地点で定期的に地下水をサンプリングし、エチレン類の濃度を測定した。結果を図 3 に示す。横軸は経過時間で、0 点が塩素化エチレン分解細菌が検出された液 (遺伝子濃度:  $10^7$  copies / m L) 5 0 L を B 地点から注入した時点である。

#### 【 0 0 4 1 】

図 3 の結果からわかるように、注入以前にはジクロロエチレンの分解は全く認められないが、注入後 2 0 日で分解が顕著になり、約 1 7 0 日後にはエチレン化が 1 0 0 % となった。

上記結果から、塩素化エチレン汚染現場においても、塩素化エチレン分解細菌が検出された液を添加することは塩素化エチレン分解反応を促進する効果があることがわかる。

#### 【 0 0 4 2 】

##### 【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KURITA WATER INDUSTRIES LTD.

<120> Nucleic acid, nucleic acid to detect bacteria having biodegradabil

ity for chlorinated ethylene, probe and process to detect bacteria havin  
g biodegradability for chlorinated ethylene, and process to biodegrade f  
or chlorinated ethylene or ethane

<130> KWI00340

<150> JP 2000-227580

<151> 2000-07-24

<160> 17

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<222> (1)...(20)

<223> primer

<400> 1

gtcttaagca attaagatag

20

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<222> (1)...(24)

<223> primer

<400> 2

cgcgtaagta acctacctct aagt

24

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<222> (1)...(18)

<223> primer

<400> 3

gcttcgggaa actgaagg

18

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<222> (1)...(20)

<223> primer

<400> 4

tggrccgaca tatgttggtt

20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<222> (1)...(20)

<223> primer

<400> 5

cactaaagcc gtaaggcgct

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<222> (1)...(20)

<223> primer

<400> 6

tggtgagggg cttgcgtccg

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<222> (1)...(20)

<223> primer

<400> 7

gtgagcgtag gtggtctttc

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<222> (1)...(20)

<223> primer

<400> 8

cagcaggaga aaacggaatt

20

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<222> (1)...(19)

<223> primer

<400> 9

gtatagggag tatcgaccc

19

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<222> (1)...(25)

<223> primer

<400> 10

tgtagtagtg aactgaaagg ggaac

25

<210> 11

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<222> (1)...(25)

<223> primer

<400> 11

gacctgttaa gtcaggaact tgcac

25

<210> 12

<211> 19



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<222> (1)...(19)

<223> primer

<400> 12

tgttgctagt taaattttc

19

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<222> (1)...(20)

<223> primer

<400> 13

gttgcaacag tgcgaactgg

20

<210> 14

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<222> (1)...(19)

<223> primer

<400> 14

gctaatacccc aaagctgtc

19

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<222> (1)...(21)

<223> primer

<400> 15

gtcgatgtgc caaccgcaag g

21

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<222> (1)...(21)

<223> primer

<400> 16

acggytacct tgtaggact t

21

<210> 17

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<222> (1)...(17)

<223> primer

<400> 17

gtttgatacct ggctcag

17

【図面の簡単な説明】

【図 1】

実施例 3 の結果を示すグラフである。

【図 2】

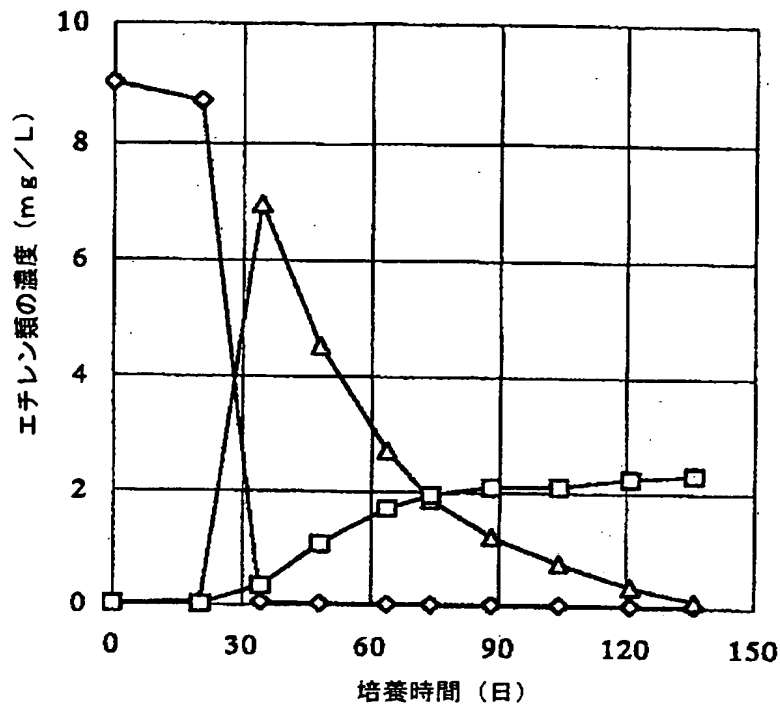
実施例 3 のコントロールの結果を示すグラフである。

【図 3】

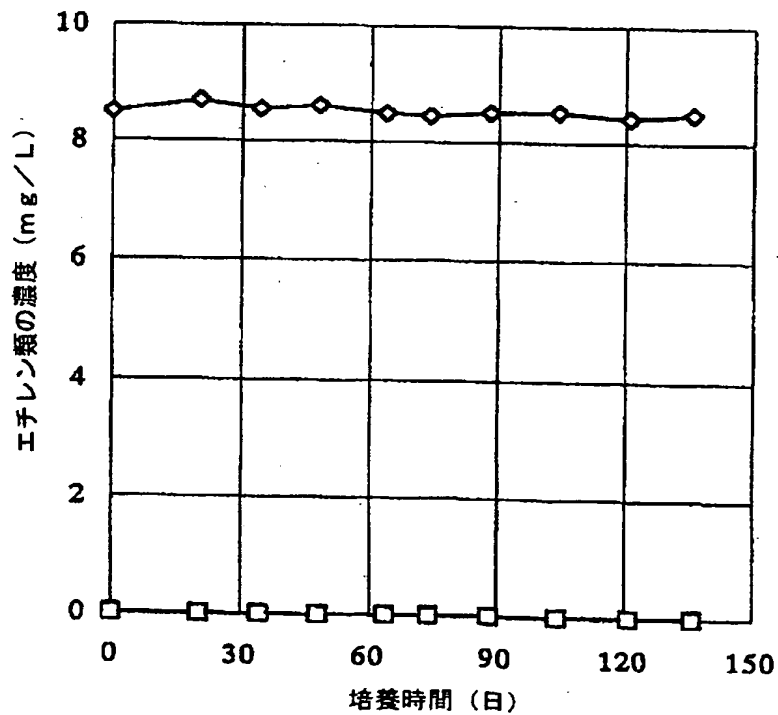
実施例 4 の結果を示すグラフである。

【書類名】 図面

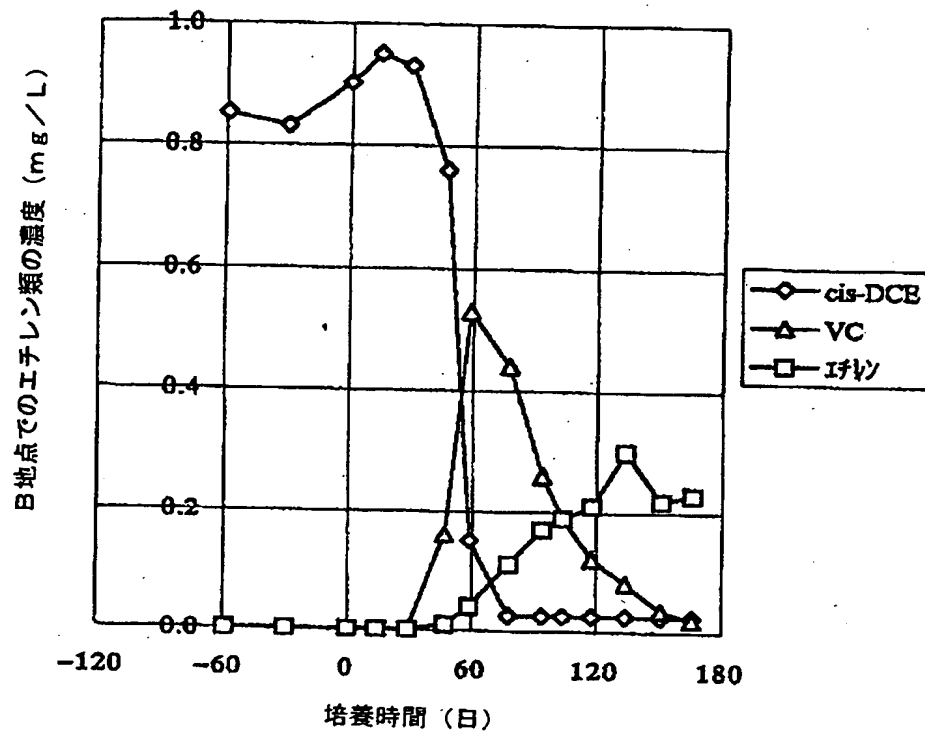
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 塩素化エチレン分解細菌の検出に利用することができる核酸であって、塩素化エチレン分解細菌の16S rRNAまたはrDNAに優先的にハイブリダイズする新規かつ有用な核酸、この核酸を用いた塩素化エチレン分解細菌の検出方法および塩素化エチレンまたはエタンの分解方法を提案する。

【解決手段】 塩素化エチレン分解細菌の16S rRNAまたはrDNAに優先的にハイブリダイズする18～25ヌクレオチドからなる核酸であって、配列番号1～15のいずれかの塩基配列、これらの塩基配列と90%以上のホモロジーを有する塩基配列またはこれらの塩基配列と相補的な塩基配列を含む核酸をプライマー、試料中の核酸を鋳型としてPCRを行い、合成されたDNA断片を検出する塩素化エチレン分解細菌の検出方法、およびこの方法で検出された塩素化エチレン分解細菌を汚染土壌や地下水に導入して塩素化エチレンまたはエタンを分解する分解方法。

【選択図】 なし

特 2001-066001

## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2001-066001
受付番号	5.0100333414
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成13年 3月14日

### <認定情報・付加情報>

【提出日】	平成13年 3月 9日
-------	-------------

次頁無

特 2001-066001

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001063]

1. 変更年月日	1990年 8月10日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都新宿区西新宿3丁目4番7号
氏 名	栗田工業株式会社